

인체 대장암의 진행과 DCC 유전자 및 단백질 발현과의 연관성

인제대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실, ²연양보람병원 해부병리과, ³백인제 기념연구소, ⁴고신대학교 의과대학 외과학교실

김종익 · 정해진² · 양영일^{1,3} · 백계형³ · 윤혜경¹ · 홍관희 · 최경현⁴

DCC Gene and Protein Expression in Colorectal Cancer

Jong Ik Kim, M.D., Hae Jin Jeong, M.D.², Young Il Yang, M.D.^{1,3}, Kye Hyung Paik, M.D.³, Hye Kyoung Yoon, M.D.¹, Kwan Hee Hong, M.D., Kyung Hyun Choi, M.D.⁴

Departments of Surgery and ¹Pathology, Inje University College of Medicine, ²Department of Pathology, Eonyang Boram Hospital, ³Paik Inje Memorial Institute, ⁴Department of Surgery, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Purpose: The germline, or somatic, inactivation of tumor suppressor genes, through point mutation, or deletion, plays an important role in carcinogenesis. Several gene alterations, such as adenomatous polyposis coli (APC), deleted in colorectal cancer (DCC) and p53, have been detected in the development of colorectal cancer. Within these genes, a loss of heterozygosity (LOH) at the DCC gene locus was frequently associated with colorectal tumors, and the LOH of the DCC gene, and the expression of the DCC protein, might be related to malignant formation and metastasis. The aim of this study was to determine the DCC LOH and the expression of DCC protein in colorectal cancers, and evaluate their prognostic value and relationship with the clinicopathological data.

Methods: Fifty colorectal cancer tissues were obtained from resected specimens. Using formalin-fixed paraffin-embedded sections as a source of DNA, we examined the DCC protein in the tissue through immunohistochemical stainings and immunoblotting analysis, the DCC LOH through a polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP).

Results: DCC LOH was observed in 24 of the 50 patients (48.0%). The expression of the DCC protein was decreased in the cancer tissue (62.3±23.6%) compared with the adjacent normal mucosa inform the immunoblotting analysis. A decreased DCC protein expression was also observed from the immunohistochemistry, which coincided with the immunoblotting analysis. However, both the DCC

LOH and the decreased DCC protein were not related to the clinical and pathological parameters, such as location of tumor, tumor size, histological type and the venous, and lymphatic invasions. There were significant correlations between the DCC protein expression and tumor progression, and hematogenous metastasis ($p < 0.05$).

Conclusions: A decreased expression of the DCC protein was noted in human colorectal cancers, and there was a significant relationship between the expression of the DCC protein and distant metastasis, but there was no correlation between the DCC LOH and distant metastasis. These results suggest that the expression of the DCC protein might be related to tumor progression and metastatic potential, and the DCC protein immunoreactivity may be a useful prognostic factor in patients with colorectal cancers. *J Korean Soc Coloproctol 2003;19:26-38*

Key Words: DCC gene, Protein expression, LOH, Colorectal cancer

DCC 유전자, 단백질 발현, 이합접합성 상실, 대장암

서 론

대장암(Colorectal carcinoma, CRC)에 있어서 종양유전자와 종양억제유전자의 다단계적인 변이가 복합적으로 작용하여 암의 생성과 진행에 관계한다.¹⁻⁶ CRC의 생성과 진행은 대개 정상 세포에서 증식성 병변, 이형성 병변, 선종, 그리고 침윤성 암에 이르는 연속적인 여러 단계를 거치며, 각 단계에서 분리된 세포에서는 다양한 종양유전자와 종양억제유전자의 변이가 관찰되었다. CRC의 발생과 진행과정은 각 과정마다 중요하게 작용하는 유전자가 존재하며, K-ras, adenomatous polyposis coli gene (APC), deleted in colorectal cancer gene (DCC), 그리고 p53 등의 대표적인 유전자 변이가 관여하는 분자유전학적 생성 및 진행 기전이 제시되었다.¹

1988년 Vogelstein 등¹은 18번 염색체 장완에 위치한 DCC 유전자를 발견하였고, 초기 선종에서 침윤성

책임저자: 김종익, 부산광역시 수영구 광안 4동 377-13
사랑의 외과(우편번호: 613-104)
Tel: 051-756-4488, Fax: 051-756-1004
E-mail: joikim121@yahoo.co.kr

이 논문은 2000년도 인제대학교 학술연구조성비의 지원을 받았음.

암종의 모든 단계에 있는 세포에서 DCC 유전자 변이가 발견되어, DCC 유전자가 CRC의 생성과 진행에 연관성이 있다고 보고하였다. 또한 DCC 유전자를 인위적으로 발현시킨 대장암 세포에서 종양의 생성능력이 소실된다는 연구는 DCC 유전자가 종양억제유전자로 그 역할을 담당할 것으로 보고하였다.⁷ DCC 단백질은 세포막의 안과 밖에 위치하는 면역글로불린 계열의 단백질이고, 그 기능은 정확하게 밝혀진 바는 없지만 세포 간 그리고 세포-기질 사이의 신호전달에 관여하여 세포의 분화, 성장, 그리고 종양의 전이에 관여할 것으로 추측되고 있다.⁴ 특히 간으로 원격전이가 동반된 CRC의 암세포에서 DCC 단백질의 발현이 소실되거나 심하게 감소되었다는 연구결과는 DCC 단백질이 CRC의 전이과정에도 작용함을 시사하였다.⁸ 그러나 여러 임상적 연구에서 DCC 유전자의 발현 정도와 전이와의 연관성에 대하여 상반된 결과들이 보고되어 있어,^{2,4,6,8} CRC에서 전이와 관계하는 DCC 유전자 발현의 의미는 명확히 규명되어 있지 않다. DCC 유전자의 변이는 CRC의 초기 병변보다는 진행성 병변에서 높은 빈도로 검출되었으며,¹ DCC 유전자의 변이가 동반된 CRC는 예후가 불량하다고 보고되었다.⁹ 즉 DCC 유전자 변이와 단백질 발현 정도는 CRC의 생성뿐만 아니라 전이과정에도 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

저자는 외과적으로 절제된 산발성 CRC를 대상으로 면역블로팅 방법과 면역조직화학 방법으로 DCC 단백질 발현을 정량적으로 측정하고, 이를 CRC의 임상-병리학적 인자와의 연관성을 분석하여, DCC 단백질 발현 정도와 CRC의 임상-병리학적 인자와의 연관성과 CRC의 진행과 전이와의 연관성을 규명하고자 본 연구를 시도하였다. 또한 DCC 유전자의 변이 여부를 조사하여 DCC 유전자의 변이가 단백질 발현과 CRC의 전이에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

방 법

1) 연구 재료

1998년 1월부터 4월까지 부산 백병원에서 외과적으로 절제가 가능했던 CRC 환자 50예를 대상으로 연구하였다.

2) 연구 방법

(1) 임상적 특성 연구: 연구대상 환자들의 임상기록지와 병리결과보고서를 검토하여 성별, 연령, 종양의 위치와 크기, 혈청 CEA 값, 그리고 임상적 병기를 조

사하였다. 종양의 위치는 비장 굴곡부를 중심으로 근위부인 우측 대장과 직장을 포함한 좌측 대장으로 구분하였다. 육안적 분류는 Borrmann 분류법을 기준으로 Borrmann I형은 돌출형(Exophytic)으로, Borrmann II형, III형, 그리고 IV형은 비돌출형(Nonexophytic)으로 분류하였다. CRC의 크기는 종양의 최대 장경을 이용하였다.¹⁰ CRC의 진행 정도는 변형된 Astler-Coller 병기 분류법을 이용하였다.¹¹ 즉 림프절 침범이 없는 B1, B2를 병기 B군으로, 림프절 전이가 있는 C1 및 C2를 병기 C군으로, 원격전이가 동반된 CRC는 병기 D군으로 분류하였다.

(2) 병리조직학적 특성 연구: CRC의 병리조직학적 연구는 선종 동반여부, 조직학적 분화도, 암세포의 점액질 생성정도, 암세포 주위로 림프양 반응정도, 암세포의 침윤 양상, 혈관 침범, 림프관 침범 등 병리적 인자를 조사하였다. 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀으로 포매한 파라핀 블록으로부터 4~5 μ m의 두께로 박절하였으며, 슬라이드는 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 병리학적 분석을 시행하였다. CRC의 조직학적 분류와 분화도는 한국인 대장암 취급지침서와 WHO 분류법을 기준으로 하였으며 종양 내 암세포의 선 구조 형성이 90% 이상인 경우는 고분화군, 10~90%의 선 구조가 보인 경우는 중분화군, 10% 미만으로 형성된 경우는 저분화군으로 분류하였다.¹² 종양 내 점액 형성 정도는 Wiggers 등¹³의 기준에 따라, 점액성분이 전혀 관찰되지 않는 군(absent)과, 점액 성분이 50% 미만인 국소성군(focal) 및 50% 이상인 우세군(predominant)으로 구분하였다. Graham과 Appelman의 기준에 의거하여 림프양 반응은 개별적인 림프구 침범이 없는 군(absent)과 배 중심이 동반되며 림프구 침윤이 현저한 군(present)으로 분류하였다.¹⁴ CRC의 침윤 양상은 Jass 등의 분류에 따라 팽창형(expansive), 침윤형(invasive), 두 가지 양식이 혼재하는 혼합형(mixed)으로 분류하였다.¹⁵

(3) DCC 단백질 발현 조사

① DCC 단백질 발현의 면역조직화학적 검사: 수술 근위 절제연의 정상 점막조직과 암 조직의 파라핀 블록을 선택하여 각각 4 μ m 두께의 절편을 만들어 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간, 100% xylene에서 10분간 2회 처리시켜 파라핀을 제거하였다. 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50% 계열 알코올로 순차적으로 10분간 함수 과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 이후 슬라이드는 메탄올과 30% 과산화수소수가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에 10분간 처리하여 내인성 pe-

oxidase를 차단하였다. 조직 내 항원성을 회복시키기 위하여 1% zinc sulfate (Sigma Chemical Co., USA)가 포함된 10 mM Citrate완충액(pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 microwave 오븐을 이용하여 5분 동안 3번 열을 가하였다. 조직내 항체에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위하여 슬라이드는 0.5% 정상 염소 혈청(Dako, USA)을 함유한 Tris-buffered saline (TBS)용액에 30분간 실온에서 반응시켰고, 이후 슬라이드는 mouse anti-human DCC (5µg/mL)와 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 1% Tween 20 (Bio-Rad, USA)이 포함된 TBS로 10분간 3회 수세하였고, 슬라이드는 goat biotinylated anti-mouse IgG (Dako, USA)와 실온에서 30분간 반응시켰다. TBS로 3차례 수세한 후 슬라이드는 horse raddish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (Dako, USA)과 실온에서 30분간 반응시키고 다시 TBS로 3회 수세하였다. 최종적으로 슬라이드는 0.05% DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co., USA)/0.01% H₂O₂가 함유된 TBS로 10분간 실온에서 발색시켰다. 음성대조는 일차 항체 대신 TBS를 사용하여 위와 동일한 과정으로 염

색하였다. 염색의 결과 판정은 두 명의 병리의사가 독립적으로 광학 현미경으로 관찰하였고, 침윤부에 있는 암세포의 발현정도와 정상 점막에서 발현되는 정도를 비교하여 정상점막의 발현정도보다 50% 미만으로 감소한 경우를 가군으로, 50% 이상 DCC 단백질 발현이 보존된 경우를 나군으로 분류하였다(Fig. 1).⁴

② DCC 단백질 발현의 정량 검사; 정량적인 DCC 단백질의 발현을 조사하기 위하여 면역블로팅(Western, Immunoblotting)검사를 이용하였다. 외과적으로 절제된 CRC는 육안적으로 검사하여 가장 깊게 침윤된 중앙 부위와 정상 점막에서 각각 조직을 취하여 액체 질소와 Isopentene을 이용하여 급속 동결한 후 영하 80°C에서 보관하였다. 암 및 정상조직은 분쇄기로 잘게 부순 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 2 mM calcium chloride)를 첨가하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 5분 동안 3,000 × g에서 원심분리한 후 상층액은 microtube에 옮기고 Lowry 방법을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 1µg에 해당하는 정상 및 암종 단백질은 동량의 loading buffer (20% glycerol, 4.6% sodium dodecyl

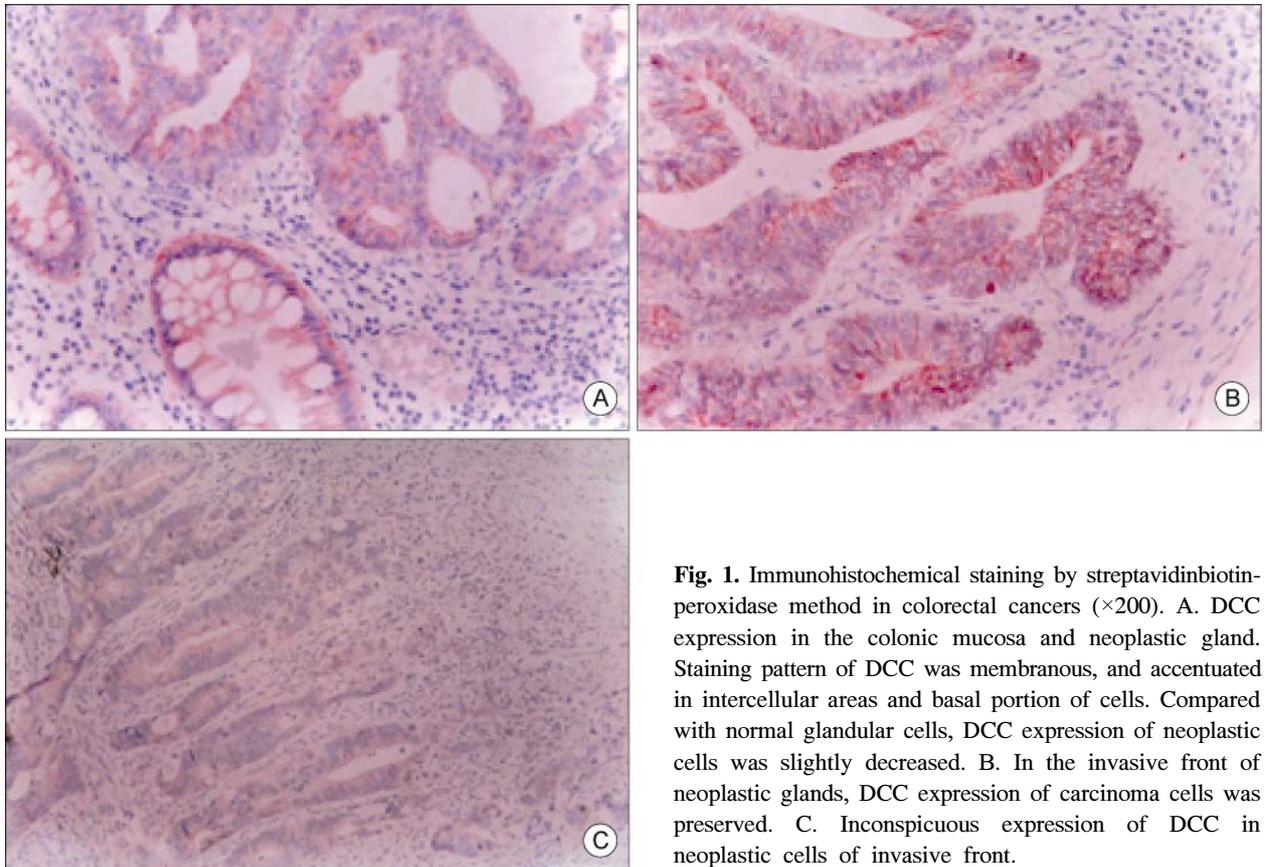


Fig. 1. Immunohistochemical staining by streptavidinbiotin-peroxidase method in colorectal cancers (×200). A. DCC expression in the colonic mucosa and neoplastic gland. Staining pattern of DCC was membranous, and accentuated in intercellular areas and basal portion of cells. Compared with normal glandular cells, DCC expression of neoplastic cells was slightly decreased. B. In the invasive front of neoplastic glands, DCC expression of carcinoma cells was preserved. C. Inconspicuous expression of DCC in neoplastic cells of invasive front.

sulfate (SDS), 125 mM Tris-HCl pH 6.8)와 혼합한 후 5분간 100°C에서 가열하였고, 이후 7.5% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 comassie blue와 silver 염색을 시행하여 동량의 단백질이 분리된 것을 확인한 후(Fig. 2) polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, USA)막으로 이동시켰다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 PVDF막은 실온에서 30분 동안 5% skimmed milk가 포함된 TBS로 처리하였다. 반응액을 따라 낸 후 PVDF막은 일차항체 (2µg/mL)가 포함된 TBS와 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. DCC 발현을 조사하기 위하여 사용한 일차항체는 DCC 단백질의 세포 내 domain 영역과 특이성이 있고 포르말린에 고정된 조직에서도 항원을 검출할 수 있는 mouse anti-human DCC (G97-449, Pharmingen, USA)을 이용하였다. 일차항체와 반응이 끝난 PVDF막은 TBS로 10분간 3차례 수세하였고, 수세 후 PVDF 막은 biotin이 붙어있는 이차항체(Biotinylated anti-mouse IgG, Novocastra, UK)와 실온에서 30분간 반응시켰으며 다시 TBS로 10분간 3차례 수세하였다. 이후 PVDF 막은 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Amersham, UK)과 30분간 실온에서 반응시키고 다시 TBS로 3차례 수세하였다. NBT/BCIP (BioRad, USA)을 발색제로 사용하여 PVDF막을 발색시켰다(Fig. 2). 밴드의 발현 정도는 ScanJet 4C (Hewlett Packard, USA)을 이용하여 흑백모드로 영상을 추출한 후 디지털화시켰다. CRC의 DCC 단백질의 발현 정도는 영상분석 프로그램인 Photoshop (version 5.0, Adobe, USA)을 이용하여 정상조직과 암 조직의 발현되는 밴드의 강도를 측정하여 정상조직에 대한 암조직의 발현강도를 백분율(암조직 밴드의 강도/정상조직 밴드의 강도 ×100)로 환산하여 수치화 하였다.

(4) DCC 유전자의 이합접합성 상실 분석

① 파라핀 블록에서 정상 및 암 조직에서 DNA 분리; DCC 유전자의 이합접합체 소실 여부를 조사하기 위하여 정상과 암조직에서 각각 DNA를 분리하였다. 정상 및 암조직의 파라핀 블록은 보관상태가 양호하며 균등한 조직학적 소견을 보이는 파라핀 블록을 H&E 염색 슬라이드를 검색하여 각각 선택하였다. 파라핀 블록에서 7µm 두께로 절편의 크기에 따라 5~15개의 절편을 유리 슬라이드에 부착시켰고, 각 슬라이드는 60°C에서 1시간, 100% xylene에 10분간 2회 반응시켜 파라핀을 제거하였다. 슬라이드는 100%, 95% 에탄올에 세척하여 xylene을 제거한 후 공기 중에 건조시켰다. 정상 및 암조직은 현미경으로 관찰하여 25-gauge

주사침으로 두 조직의 혼합을 최소화시켜 각각의 조직을 분리하였으며, 제거된 조직은 DNA 추출 전까지 microtube에 넣어 영하 20°C에서 보관하였다. 분리된 조직은 각 절편당 30µm의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl)를 첨가하여 조직과 반응액을 혼합하였다. microtube에 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (CalBiochem, USA)와 300µg/mL의 Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가한 후 55°C에서 조직이 충분히 용해될 때까지 반응시켰다. 95°C에서 10분간 가열하여 proteinase K를 불활성화시켰으며 이후 조직 용해액은 DNA extraction kit (Qiagen, Germany) 혹은 phenol/chloroform을 이용하여 불순물을 제거하였으며 ethanol을 사용하여 정상 및 암 조직에서 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA의 순도와 농도는 광비색계로 측정하였고, 1% agarose gel (Promega, USA)에서 전기 영동하여 DNA의 순도와 농도를 재차 확인하였다.

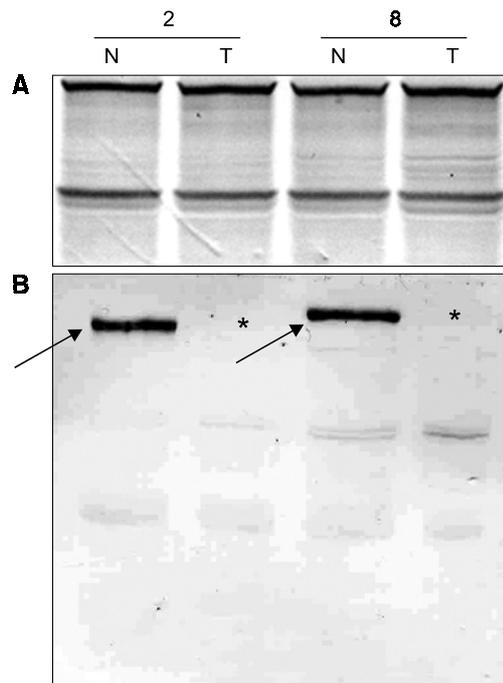


Fig. 2. Immunoblot evaluation for expression of DCC antigen. A. 1µg samples of each lane were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and performed silver staining. Same amount of proteins were loaded in each lanes. B. Gel was electrophoretically transferred to PVDF membrane, and immunoblotted with antiDCC. Proteins from normal colorectal mucosa expressed DCC protein (arrow). In colorectal carcinomas, DCC protein was completely abolished (asterisk). N = normal colorectal mucosa; T = colorectal carcinoma; 2 = patient 2; 8 = patient 8.

② 이합접합성 상실의 분석; DCC 유전자의 이합접합성 상실(Loss of Heterozygosity, LOH)의 분석은 1개의 CA repeat 부위인 *D18S69*,¹⁰ 2개의 다형성 부위(polymorphic site, M2, M3),^{16,17} 그리고 1개의 VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 부위¹⁸를 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 해당 유전자 영역을 증폭한 후 DCC 유전자의 LOH 여부를 조사하였다. DCC 유전자의 분석에 사용된 primer의 염기서열과 정보는 Table 1에 제시되어 있으며, primer는 합성주문을 의뢰(Genotech, Daeduck, Korea)하여 사용하였다. PCR은 최종 부피가 50 μ l에 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 μ M MgCl₂), 200 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs, Pharmacia, UK), 5 pM primer, 1 Units Taq DNA Polymerase (Takara, Japan), 500 ng DNA로 구성하였다. PCR반응은 Thermal Cycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus Corp., USA)를 이용하여 95°C에서 30초, 50~55°C에서 30초, 72°C에서 30초 주기로 총 45회 반응한 후 최종적으로 72°C에서 5분간 반응시켰다.

PCR 반응이 끝난 후 증폭된 유전자는 gene clean kit (BIO101, USA)를 이용하여 정제하였다. *D18S69*는 0.7% MDE gel (FMC, USA)을 이용하여 single strand conformation polymorphism (SSCP)를 시행하여 allele 양상을 비교하여 LOH 여부를 조사하였다. M2 및 M3 부위 유전자의 LOH 검사에는 제한효소로 처리하여 그 크기를 비교하여 분석하였다. 즉 *MspI* 제한효소 (New England Biolabs, USA)로 절단하여 12% polyacrylamide gel에서 분리한 후 절단된 유전자 크기를 정상과 암종 유전자를 비교하여 LOH를 조사하였다. VNTR-1 부위는 12% polyacrylamide gel로 전기영동하여 증폭되는 밴드의 양상과 수를 비교하여 LOH 여부

를 검사하였다.

(5) 세포증식능 조사: 암종 세포의 세포증식능은 Ki-67 (1 : 150, Zymed, USA)을 일차항체로 이용하여 DCC 단백질의 발현에 사용한 동일한 면역조직화학적 방법을 이용하여 조사하였다. 세포증식능은 1,000개의 세포 중 양성인 세포를 세어 백분율로 산정한 값을 Ki-67 세포증식지수를 이용하였다.

(6) 통계학적 분석: DCC 발현과 LOH와 임상학적 및 병리학적 인자, 세포증식지수 간의 연관성은 SPSS 프로그램을 이용하여 chi-square 방법으로 검정하였으며 유의 수준은 P 값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

1) 임상적 및 병리적 특성 분석

50예 중 남녀 환자수는 각각 26명(52.0%)과 24명(48.0%)으로 성비가 약 1.1 : 1이었고, 평균연령은 56.5 \pm 11.7이었다. 종양의 위치는 비장 굴곡부를 중심으로 근위부인 우측 대장에 발생한 예가 38예(76.0%)였고, 직장을 포함한 좌측 대장은 12예(24.0%)였다. 육안적으로 돌출형은 10예(20.0%), 비돌출형은 40예(80.0%)이었다. 종양의 크기는 평균 5.6 \pm 2.0 cm였다. 종양의 병기는 B군이 24예(48.0%), C군은 16예(32.0%)였고, D군은 10예(20.0%)였다. 조직학적으로 진단된 선종을 동반한 경우는 9예(5.8%), 동반하지 않은 경우는 41예(94.2%)였다. 조직학적 분화도는 고분화군이 14예(28.0%)였으며, 중분화군 34예(68.0%), 저분화군 2예(4.0%)였다. 종양 내 점액 형성 정도는 생성이 전혀 없는 군이 34예(68.0%), 국소성군이 11예(22.0%), 우세군은 5예(10.0%)였다. 종양 주위의 림프양 반응은 개별적인 림프구 집합이 없는 군이 44예(88.0%), 림프구 집

Table 1. Primer sequences used for identification of loss of heterozygosity in DCC

Primer name	Sequence (5' to 3')	T _A (°C)	Size (b.p.)	
M3	Sense	CGA CTC GAT CCT ACA AAA TC	50	396
	Antisense	TCT ACC CAG GTC TCA GAG		
M2	Sense	TGC ACC ATG CTG AAG ATT GT	53	240
	Antisense	AGT ACA ACA CAA GGT ATG TG		
VNTR-1	Sense	GAT GAC ATT TTC CCT CTA G	53	160~200
	Antisense	GTG GTT ATT GCC TTG AAA AG		
D18S69	Sense	CAT TAG CAG TCT GGA AAT CCT C	55	194~210
	Antisense	CGC TAT TGT ACT GAA AAC CTG A		

합이 있는 군이 6예(12.0%)였다. 종양의 침윤양상은 팽창형이 7예(14.0%), 침윤형은 9예(18.0%), 혼합형은 34예(68.0%)였다. 혈관 침범이 있는 경우 9예(18.0%)와

없는 경우는 41예(82.0%)였고, 림프관 침범이 있는 경우 24예(48.0%)와 없는 경우가 26예(52.0%)였다 (Table 2~5).

Table 2. Relationship between clinical parameters and DCC expression and DCC value*

		DCC expression [†]		DCC value (%) [‡]	
		Group 가(%) n=20	Group 나(%) n=30	Mean value	Standard deviation
Sex	Male	11 (55.0)	15 (50.0)	62.3	22.1
	Female	9 (45.0)	15 (50.0)	62.3	25.4
Age		56.9±11.2	56.3±12.1		
Site	Right	14 (70.0)	24 (80.0)	63.9	29.2
	Left	6 (30.0)	6 (20.0)	57	21.8
Size		6.3±2.0	4.9±1.8		
Serum CEA [§]		56.3±145.9 [§]	2.6±1.6 [§]		
Gross feature	Exophytic	1 (5.0)	9 (30.0)	80.5	10
	Non-exophytic	19 (95.0)	21 (70.0)	57.7	23.9
Adenoma	None	16 (80.0)	25 (83.3)	61.2	24.5
	Associated	4 (20.0)	5 (16.7)	67.2	19.4
Astler-Coller stage ^{,¶}	B	6 (30.0)	18 (60.0)	75.4	15.6
	C	6 (30.0)	10 (33.3)	60.5	18.7
	D ^{,¶}	8 (40.0) [¶]	2 (6.7) [¶]	31.6	18

*P>0.05; [†] DCC expression on immunohistochemistry; [‡] DCC value on immunoblotting; ^{§, ||, ¶}P<0.05.

Table 3. Relationship between pathologic parameters and DCC expression and DCC value*

		DCC expression [†]		DCC value (%) [‡]	
		Group 가(%) n=20	Group 나(%) n=30	Mean value	Standard deviation
Histologic differentiation	Well	7 (35.0)	7 (23.4)	60.4	26.5
	Moderate	12 (60.0)	22 (73.3)	63.7	23.2
	Poor	1 (5.0)	1 (3.3)	51	5.7
Mucin component	Absence	11 (55.0)	19 (63.3)	61.4	27
	Focal	4 (20.0)	4 (13.3)	58	15.6
	Prominent	5 (25.0)	7 (23.4)	70.8	15.6
Lymphoid reaction	Mild	16 (80.0)	28 (93.3)	62.8	23.3
	Prominent	4 (20.0)	2 (6.7)	58.5	28.1
Invasion pattern	Expansile	2 (10.0)	5 (16.7)	70	11.3
	Invasive	6 (30.0)	3 (10.0)	48.7	21.4
	Mixed	12 (60.0)	22 (73.3)	64.3	25.1
Lymphatic invasion	Absence	8 (40.0)	18 (60.0)	70.8	17.3
	Presence	12 (60.0)	12 (40.0)	53	17.3
Venous invasion	Absence	15 (75.0)	26 (86.7)	65.9	21.9
	Presence	5 (25.0)	4 (13.3)	45.9	18.8
Ki-67 index		32.8±12.5	28.6±15.8		

*P>0.05; [†] DCC expression on immunohistochemistry; [‡] DCC value on immunoblotting.

Table 4. Relationship between clinical parameters and LOH affecting DCC gene in colorectal cancer patients*

	DCC LOH	
	Absent (%) n=26	Present (%) n=24
Sex		
Male	13 (50.0)	13 (54.2)
Female	13 (50.0)	11 (45.8)
Age	55.9±10.8	57.2±12.7
Site		
Right	20 (76.9)	18 (75.0)
Left	6 (23.1)	6 (25.0)
Size	5.0±1.8	5.9±2.2
Serum CEA [†]	3.2±2.2 [†]	46.6±134.4 [†]
Gross feature		
Exophytic	5 (19.2)	5 (79.2)
Non-exophytic	21 (80.8)	19 (20.8)
Adenoma		
None	22 (84.6)	19 (79.2)
Associated	4 (15.4)	5 (20.8)
Astler-Coller stage		
B	13 (50.0)	11 (45.8)
C	8 (30.8)	8 (33.4)
D	5 (19.2)	5 (20.8)

*P>0.05; [†] P<0.05.

2) DCC 단백질 발현

(1) DCC 단백질 발현의 분석결과: 면역블로팅을 시행한 결과 DCC 단백질은 대조군으로 사용된 모든 정상 조직에서 분명한 밴드를 관찰할 수 있었지만 암조직에서는 정상 조직에 비해 발현이 감소되거나 소실되어 있었다(Fig. 2). 면역블로팅에서 조사된 암조직 내 DCC 단백질은 정상 조직에 비하여 62.3±23.6% 정도로 발현이 감소되어 있었다. 면역조직화학 검사에서 정상 조직에서는 DCC 단백질이 세포막을 따라 미만성으로 발현되었다. 그러나 암조직에서 DCC 단백질의 발현 정도는 DCC 발현 가군이 43.3±20.9이었고, DCC 발현 나군은 75.0±15.6으로 면역블로팅의 결과와 유사하였으며, DCC 단백질의 발현은 정상 조직에 비하여 암조직에서는 감소되어 있었다. 면역조직화학 검사와 면역블로팅의 결과는 일정한 양상으로 관찰되었으며, 두 검사 방법의 결과가 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다(Table 2, 3)(Fig. 3).

(2) DCC 단백질의 발현과 임상적 및 병리적 인자와의 관계: 면역블로팅 방법으로 조사한 DCC 단백질의 발현 정도는 성별, 나이, 종양의 위치 및 크기와는 무관하

Table 5. Relationship between pathologic parameters and LOH affecting DCC gene in colorectal cancer patients*

	DCC LOH	
	Absent (%) n=26	Present (%) n=24
Histologic differentiation		
Well	9 (34.6)	5 (20.8)
Moderate	17 (65.4)	17 (70.8)
Poor	0 (0.0)	2 (8.4)
Mucin component		
Absence	17 (65.4)	17 (70.8)
Focal	6 (23.1)	5 (20.8)
Prominent	6 (23.1)	5 (20.8)
Lymphoid reaction		
Mild	24 (92.3)	20 (83.3)
Prominent	2 (7.7)	4 (16.7)
Invasion pattern		
Expansile	4 (15.3)	4 (16.7)
Invasive	6 (23.1)	3 (12.5)
Mixed	16 (61.6)	17 (70.8)
Lymphatic invasion		
Absence	14 (53.8)	12 (50.0)
Presence	12 (46.2)	12 (50.0)
Venous invasion		
Absence	21 (80.8)	20 (83.3)
Presence	5 (19.2)	4 (16.7)
Ki-67 index	25.7±14.3	34.1±21.9

*P>0.05.

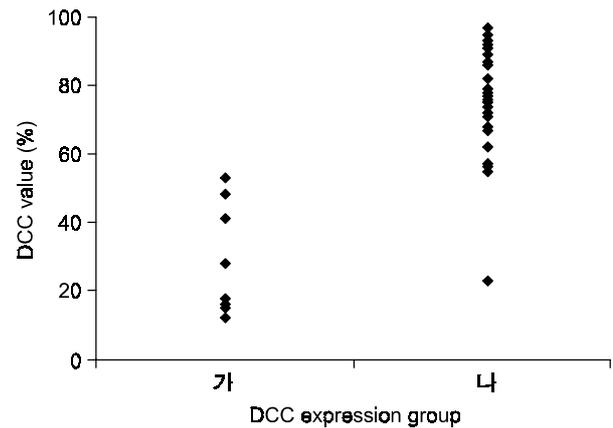


Fig. 3. Relationship between DCC value on immunoblotting and DCC expression group on immunohistochemistry.

였다(P>0.05). 그러나 혈청 CEA값은 DCC 발현 가군이 56.3±145.9였고, 나군이 2.6±1.6으로 종양 세포 내 DCC 단백질의 발현이 감소할수록 혈청 CEA값은 유의

하게 증가되었다($P < 0.05$). 그러나 기타 임상적 인자와는 연관성이 없었다($P > 0.05$)(Table 2). 병기가 진행될수록 DCC 단백질의 발현은 감소되는 경향을 보였다. 특히 병기 D군은 DCC 단백질 발현 가군이 8예(40.0%), 나군이 2예(6.7%)로 DCC 단백질의 발현이 감소된 가군에서 유의하게 감소로 전이된 Dukes 병기 D군의 빈도가 많았다($P < 0.05$). 또한 면역블로팅 검사에서 Dukes 병기 D군의 DCC 발현은 31.6%로 병기 B군의 75.4%보다 유의하게 감소되어 있었다($P < 0.05$). 그러나 기타 병리학적 인자와는 연관성을 찾을 수 없었다. 또한 DCC 단백질의 발현정도는 암세포 Ki-67 세포 증식지수와도 무관하였다(Table 3).

3) DCC 유전자의 이합접합성 상실

(1) DCC 유전자의 이합접합성 상실의 빈도: 50예의 CRC 환자의 정상 점막과 종양 조직에서 추출한 DNA를 이용하여 D18S69 영역을 증폭하여 SSCP를 시행한 결과 총 45예에서 결과를 분석할 수 있었으며 정상과 비교하여 allele의 소실이 있는 CRC는 5예(11.1%)였다(Fig. 4A). M2 및 M3 영역을 PCR을 실시한 다음 MspI 제한효소에 대한 인식부위의 여부에 따라 3가지 형태의 띠를 보여주었다. M2 영역을 증폭한 PCR 산물은 MspI 제한효소에 대한 인식부위가 없는 경우에는 396 염기쌍이 나누어지지 않고 한 띠만을 나타내고 있었으며, 인식부위가 있는 DNA의 경우에는 257와 139의 염기쌍을

보이는 두 띠로 나타냈다(Fig. 4B). M3 영역을 증폭한 PCR 산물은 MspI 제한효소에 인식부위가 없는 경우 240 염기쌍의 밴드가 관찰되었으며, 인식부위가 있는 경우에는 137와 103의 염기쌍을 나타냈다(Fig. 4C). 정상 점막에서 분리한 유전자가 이합접합성을 나타내는 경우는 하나의 대립형질 DNA에는 인식부위가 없어 나누어지지 못한 크기의 밴드와 인식부위가 있는 다른 하나의 대립형질에서 형성된 2개의 밴드로 인하여 총 3개의 밴드를 보여주었다(Fig. 4). 이 중에서 3개의 띠를 형성하는 이형접합성을 보인 경우는 M2 영역은 50예 중 46예, M3영역은 45예이었다. 정상조직에 대한 이형접합성을 확인한 후 종양 조직과 이합접합성 소실에 대한 검색을 시행한 결과 M2 영역에서 9예(18.0%), M3 영역에서 7예(14.0%)에서 LOH가 검출되었다. VNTR은 정상과 종양 조직에서 증폭된 PCR 산물을 전기영동으로 분리한 후 증폭되는 밴드의 크기와 수를 비교함으로써 LOH 여부를 조사하여 7예(14.0%)의 LOH를 확인할 수 있었다(Fig. 4D). 3가지 방법으로 4개의 DCC 유전자 영역을 조사한 결과 총 50예의 CRC 중 24예(48.0%)에서 LOH를 확인할 수 있었다(Table 4, 5).

(2) DCC 유전자의 이합접합성 상실과 임상적 및 병리적 인자와의 관계: DCC 유전자의 LOH는 Dukes 병기를 포함한 임상적 인자와는 연관성을

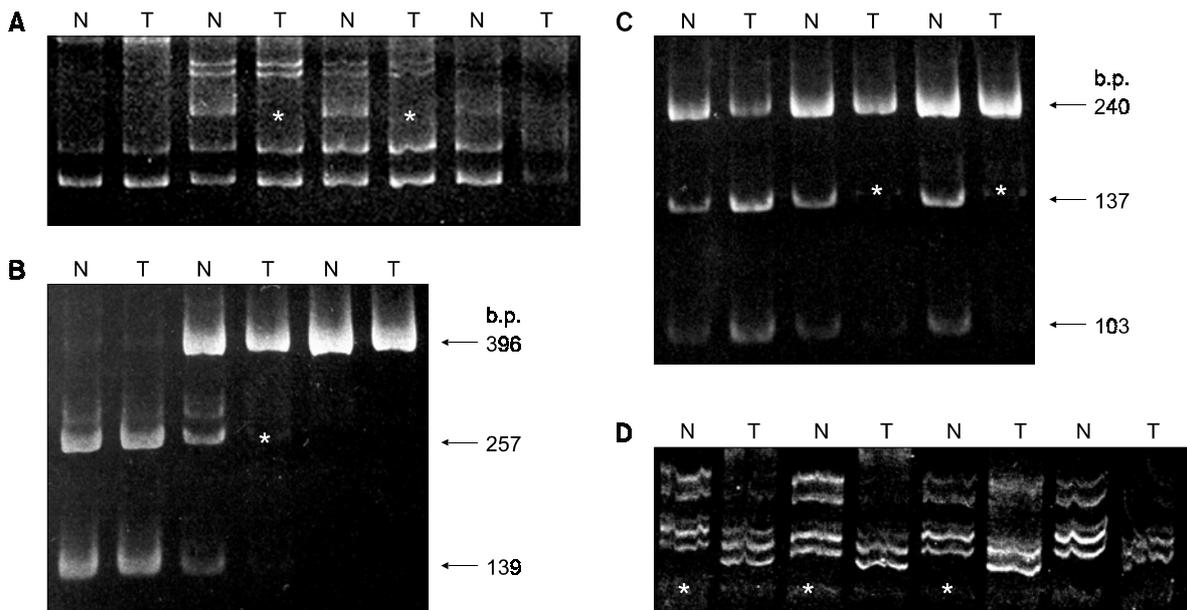


Fig. 4. PCR-LOH analysis for DCC gene in colorectal carcinomas. A. PCR-SSCP analysis using D18S69 locus. Allelic loss in representative cases (asterisk). B-C. PCR-RFLP analysis. Representative cases of allelic loss (asterisk) at M2 (B) & M3 (C) MspI polymorphic site. D. cases of allelic loss at VNTR (asterisk). N = normal mucosa; T = colorectal carcinoma.

Table 6. Relationship of LOH in DCC gene and expression of DCC protein*

		DCC LOH	
		Absent (%) n=26	Present (%) n=24
DCC value (%)	Mean (±S.D.)	67.4±21.2	56.8±25.3
DCC expression	Group 가	8 (40.0)	12 (60.0)
	Group 나	18 (60.0)	12 (40.0)

*P>0.05.

찾을 수 없었다(P>0.05)(Table 4, 5). 그러나 DCC 유전자의 LOH가 동반된 CRC의 경우는 혈청 CEA 값이 46.6으로 LOH의 동반이 없는 CRC의 3.2보다 유의하게 높았다(P<0.05)(Table 4). 또한 CRC의 생물학적 악성도를 대변하는 병리적 인자와의 연관성도 찾을 수 없었다(P>0.05)(Table 5). DCC 유전자의 LOH는 암세포의 Ki-67 세포증식지수와의 연관성이 없었다(P>0.05) (Table 5).

(3) DCC 유전자의 이합접합성 상실과 DCC 단백질 발현과의 연관성: DCC 유전자의 LOH가 동반된 CRC는 경우는 평균 DCC 발현율이 56.8±25.3%로 LOH가 없는 CRC의 67.4±21.2% 보다 낮았으며, LOH가 동반된 CRC는 DCC 발현A군이 12예(50.0%)로 LOH가 없는 CRC의 8예(30.8%)보다 빈도가 높았으나, DCC 발현과 DCC유전자의 LOH와는 유의한 연관성은 찾을 수 없었다(P>0.05) (Table 6).

고 찰

DCC 단백질은 190-kd 크기의 면역글로블린 계열의 단백질이다. DCC 단백질은 결직장 점막, 방광, 췌장, 신장 등에서 발현되지만 간세포에서는 발현되지 않는 것으로 알려져 있다.¹⁹ DCC 단백질은 3개의 domain으로 나누어지며 C-terminal cytoplasmic domain, transmembrane hydrophilic domain, 그리고 N-terminal extracellular domain으로 구성되어 있다.⁴ DCC 단백질의 정확한 생물학적 기능은 밝혀져 있지 않지만, DCC 단백질은 세포간 혹은 세포-기질간의 상호조절에 관여하는 세포접합인자로서 그 역할을 담당하여 세포의 성장과 분화에 관여할 것으로 알려졌다.^{3,4} DCC 단백질의 아미노산 서열은 신경접합인자(neural cell adhesion molecule, NCAM)와 구조적인 상동성을 갖는 것으로 밝혀졌으며, DCC 단백질이 세

포접합인자(celladhesion molecule)로 작용할 수 있는 것으로 제시되었다. 또한 DCC 단백질의 기능을 규명하기 위한 DCC 유전자를 파괴시킨 유전자적중생쥐(Knock-out mouse)모델에서 DCC 유전자의 발현이 없는 생쥐는 위장관계와 신경계의 성장 및 분화가 이루어지지 않는 사실이 밝혀졌다.²⁰ 이러한 연구결과는 DCC 단백질이 세포접합인자로서 세포의 성장과 분화에 관계할 것으로 확인되었다. 18번 염색체를 발현시킨 대장암 세포가 면역결핍생쥐에서 종양의 형성이 소실된다는 결과는 DCC 단백질이 종양의 생성과 진행에도 관련이 있음이 증명되었다.⁷ DCC 단백질이 caspase-3의 기질로 작용하여 세포고사(apoptosis)에도 작용하는 것으로 밝혀져 종양억제단백질로의 그 역할을 담당할 것으로 밝혀졌다.²¹ 이러한 분자생물학적인 연구결과로 DCC 단백질이 암의 진행과 전이에 깊게 관여함을 추정할 수 있다. 임상적 실험에서도 간으로 전이를 동반한 CRC에서 DCC 단백질의 발현이 소실된 반면에, 원격전이가 없는 CRC의 대부분 경우에는 DCC 단백질의 발현이 유지되었다는 결과는 DCC 단백질이 CRC의 진행과 전이와 연관성이 있음을 시사하였다.⁸

본 연구에서는 CRC 조직 내 DCC 단백질의 발현정도를 면역조직화학적 방법으로 정상 점막과 암조직에서 각각 비교 조사한 결과 정상점막과 비교하여, 암조직에서 50% 이상 DCC 단백질이 감소된 경우는 20예(40%)로서, Shibata 등⁴의 결과(50%)와 유사하였지만, 김 등²²의 74% (14/17)보다는 낮은 빈도였다. 이러한 차이는 연구자마다 DCC 단백질의 발현을 판정하는 방법과 기준이 명확하지 않고, 또한 DCC 단백질 발현을 조사하는 방법의 차이에 기인하는 것으로 생각한다. 본 연구에서는 보다 객관적인 DCC 단백질의 발현을 조사하기 위하여 면역블로팅 검사를 시행하였다. 면역블로팅 방법으로 정상 점막에서 발현되는 DCC 단백질의 정도와 CRC 조직에서 발현되는 정도를 백분율로 환산한 값은 면역조직화학 방법으로 산정한 DCC 단백질의 발현정도와 밀접한 연관성이 있는 것을 확인할 수 있었다. Gotley 등¹⁹은 CRC 조직과 전이된 암세포에서 각각 DCC 유전자의 발현을 조사하였다. DCC mRNA 와 DCC 단백질은 CRC의 각 발생단계에 있는 모든 세포에서 다양하게 검출되었으나 완전히 소실된 경우는 없었다고 하였다. 이러한 연구결과는 CRC 조직 내 DCC 유전자의 발현정도를 독립적으로 상호 비교하여 분석하는 것보다는 해당 CRC의 정상과 암세포 간의 발현정도를 비교하는 것이 보다 객관

적인 분석방법이라고 생각한다. 또한 본 연구의 결과에서 면역조직화학 기법으로 정상점막과 비교하여 DCC 단백질의 발현을 분석하는 방법이 보다 간편하고 일률적으로 사용될 수 있을 것이라고 생각한다.

DCC 단백질의 발현정도와 CRC 진행과의 연관성은 여러 연구에서 상반된 결과가 보고되어,^{4,19,23-26} DCC 단백질의 발현정도가 CRC의 진행에 관계되는 의미는 현재까지 명확하지 않다. Iacopetta 등²³은 Dukes B와 Dukes C의 환자에서 각각 38% (12/32)와 38% (6/16) 정도로 DCC 단백질의 발현이 감소되었으며, 림프절 전이와 DCC 단백질의 발현과는 연관성이 없었다고 하였다. 정상 점막, 선종, 원발성 및 전이 암에서 DCC 단백질과 DCC mRNA 발현을 조사한 실험에서 DCC 유전자 발현의 차이는 없었으며, DCC 유전자 발현이 CRC의 진행과는 연관이 없다고 주장하였다.^{19,22} 본 연구에서는 Dukes B는 24예 중 6예(25%), Dukes C는 16예 중 6예(27%)에서 DCC 단백질의 발현이 감소되어 있었으나, 림프절 전이와 DCC 단백질 발현과의 연관성은 없었다($P>0.05$). 그러나 Dukes D는 10예 중 8예(80%)에서 DCC 단백질의 발현이 감소되어, Dukes B와 Dukes C보다 유의하게 DCC 단백질의 발현이 감소되어 있었다($P=0.027$). 또한 정상 점막과 비교하여 산정한 DCC 단백질의 백분율 값은 병기가 진행될수록 유의하게 감소되었다($P=0.032$). CRC의 발생과정에서 암으로 진행될수록 DCC 단백질의 발현이 감소되었고, 특히 간전이와 동반된 CRC인 경우는 보다 현저히 감소되었다는 기타 연구의 보고와^{25,27} 본 연구의 결과는 유사하였다. Shibata 등⁴은 림프절 전이와 DCC 단백질의 발현과는 연관성이 없었지만, Dukes B에서 DCC 단백질의 발현이 유지된 환자는 5년 생존율이 94.3%로 발현이 소실된 환자의 61.6%보다 유의한 차이를 보였으며, DCC 단백질의 발현이 림프절 전이와는 연관성이 없었지만 예후인자로서 중요한 역할을 담당할 수 있다고 주장하였다.

CRC의 종양표지자인 혈청 CEA 값의 상승은 암의 진행과 상관관계가 있다고 알려져 있다.²⁸ 본 연구에서 DCC 단백질의 발현이 감소한 경우는 혈청 CEA 값이 56.3 ± 145.9 이었으나 발현이 유지된 경우는 혈청 CEA 값이 2.6 ± 1.6 였으며, DCC 단백질의 발현정도와 혈청 CEA 값과는 유의한 연관성이 있었다($P=0.037$). DCC 단백질과 CEA 값의 연관성은 병기의 진행됨에 따른 간접적인 영향의 결과인지 혹은 DCC 단백질이 CEA 발현에 직접적인 관계가 있는지는 추후 규명해야 할 필요성이 있다고 생각한다.

DCC 단백질의 발현과 임상적 및 병리적인 인자와의 연관성은 없었으며, 특히 암의 분화도와 세포 증식력과 연관성이 없는 것으로 본 연구에서 조사되었다. 생물학적으로 DCC 단백질이 세포의 성장과 분화에 관계되지만 진행성 CRC에 있어서는 그 영향력이 크지 않는 것으로 생각된다. 또한 DCC는 CRC 형성의 초기에 작용하는 것으로 알려져 있다.¹ 그러나 본 연구에서 조사된 것 같이 CRC의 진행 특히 후기 전이과정에도 중요한 영향을 미치리라 생각된다. 최근 연구결과에서 DCC 단백질이 세포의 이동과 암의 전이에 필요한 간질 내 접합인자인 netrin-1²⁹ 및 heparan³⁰과 결합하는 결과는, DCC 단백질이 CRC의 전이와 연관성이 있다는 것을 뒷받침한다.

결론적으로 Banerjee²⁶의 보고와 마찬가지로 본 연구 결과는 DCC 단백질의 발현이 감소 혹은 소실된 CRC 환자인 경우는 림프절 전이가 없더라도 수술 후 보조화학요법과 동일한 병기의 환자보다 특별한 관리가 필요할 것으로 생각된다.

1988년 Vogelstein 등¹은 CRC, 후기선종(advanced adenoma), 초기선종(earlier-stage adenoma)에서 18번 염색체의 염기서열이 소실되는 것을 관찰하였으며, 특히 18q21.3과 telomere 사이에 있는 염기서열이 집중적으로 소실되는 것이 밝혀져 deleted in colorectal cancer 유전자로 명명되었다. 초기선종(earlier stage of adenoma), 후기선종(advanced adenoma), 그리고 CRC로 갈수록 DCC 유전자의 LOH가 점차적으로 증가하였으며,^{2,9,31-34} DCC 유전자의 LOH는 초기선종에서 후기선종으로의 진행뿐만 아니라 전이성 암으로의 진행에도 연관성이 있을 것으로 생각되었다.³⁵ 본 연구에서는 50예의 CRC를 대상으로 다형성 부위(M2,M3), D18S69, 그리고 VNTR 등 총 4개의 서로 다른 DCC 유전자 부위를 표적으로 연구한 결과 24예(48%)에서 DCC 유전자의 LOH를 검출할 수 있었으며, DCC 유전자의 LOH가 CRC의 생성과 진행에 관계하는 것을 확인할 수 있었다. DCC 유전자의 LOH는 CRC의 진행과 수술 후 환자의 경과와 밀접한 연관성을 갖는다고 제시되었다.^{9,16}

Jen 등⁹은 Dukes 병기가 진행될수록 DCC 유전자의 LOH 빈도가 증가하였고, 특히 Dukes B에서 LOH를 동반한 환자는 C병기와, LOH를 동반하지 않은 경우는 A병기의 환자와 유사한 수술 후 경과를 나타내어, DCC 유전자의 LOH 여부는 환자의 예후를 판정하는 유용한 인자라고 주장하였다. 원경 전이가 동반된 CRC에서 전이가 없는 CRC보다 DCC 유전자의

LOH가 높은 빈도로 검출되어 DCC 유전자의 LOH는 암의 악성도 특히 전이와의 연관성이 제시되었다.^{23,36,37} 또한 DCC 유전자의 LOH는 혈관 침범, 림프관 침범, 간 전이와 같은 CRC의 생물학적 악성도를 추정할 수 있는 인자로서 그 중요성이 제시되었다.^{23,36,37} 그러나 DCC 유전자의 LOH가 종양의 악성도 혹은 전이와 연관성이 없다는 상반된 연구결과도 보고되었고, DCC 유전자의 LOH가 생물학적 악성도를 반영하는 지표로서 갖는 의의는 현재까지 논란이 많다.²⁴ 본 연구에서도 Duke 병기가 진행될수록 DCC 유전자의 LOH 빈도가 증가되었으나, 분화도, 림프절 전이, 림프관 침범, 혈관 침범, 간 전이와 같은 악성도를 반영하는 인자들과의 연관성은 찾을 수 없었다. 그러나 DCC 단백질의 발현 정도와 마찬가지로 DCC 유전자의 LOH가 동반된 CRC는 혈청 CEA값이 의미 있게 증가되어 있었으며, 이러한 결과는 DCC 유전자의 LOH가 암의 진행 혹은 전이와의 연관성에 대한 가능성을 제시하는 것으로 생각된다. DCC 유전자의 LOH에 대한 검출 빈도의 차이와 임상적 그리고 병리학적 의의에 대한 상반된 실험결과는 첫째, DCC 유전자가 29개의 exon과 염기수가 1.4 Mega base로 아주 큰 유전자이기 때문에³⁸ DCC 유전자의 전 영역을 조사하여 정확한 LOH 여부를 조사하기란 어렵고, 둘째, 실험대상의 차이, 셋째, DCC 유전자의 조사 부위와 실험방법의 차이에 기인한다고 생각한다. DCC 유전자의 LOH가 유전자 발현에 미치는 영향은 극히 일부에서만 연구되어 있다. DCC 유전자의 201번째 codon에서 발생한 점 돌연변이에 의해 DCC mRNA와 단백질의 발현이 소실된 것이 밝혀졌으며,³⁹ 이는 DCC 유전자의 LOH가 단백질 발현에 직접적인 영향을 미친다는 실험 결과였다. 본 연구에서 DCC 유전자의 LOH가 동반된 CRC에서는 DCC 단백질 발현율이 56.8 ± 25.3 으로 조사되어 LOH가 없는 CRC의 67.4 ± 21.2 보다 낮았다. 또한 DCC 단백질의 발현이 감소된 가군은 20예 중 12예(60%)에서 LOH가 검출되었으나, 발현이 보존된 가군은 30예 중 12예(40%)에서 LOH가 검출되어 DCC 유전자의 LOH가 있는 경우는 단백질의 발현이 감소되어 있었다. 또한 DCC 유전자의 1290번째 codon의 돌연변이는 caspase-3의 작용을 억제하여 DCC 단백질의 세포포사 기능이 소실된다고 보고되었다.²¹ 비록 본 연구에서 통계적인 유의성은 없었으나 DCC 유전자의 LOH는 유전자의 발현과 DCC 단백질 기능의 변화를 유발하여 CRC의 생성과 진행에 영향을 미칠 것으로 생각한다. 그리고 임상적인 목적으로 DCC 유전자의 전 영역에

대한 유전적 변화를 조사하는 것은 현실적으로 어렵기 때문에 간단한 면역조직화학적 방법에 의한 DCC 단백질의 발현이 CRC 환자의 임상적인 경과를 예측할 수 있는 인자로 유용할 것이라고 생각한다.

결 론

외과적으로 절제된 인체 대장암을 대상으로 정량적인 면역블로팅 검사와 반정량적인 면역조직화학적 검사를 이용하여 DCC 단백질 발현을 조사하였으며, 중합효소연쇄반응을 이용하여 DCC 유전자의 LOH 여부를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 면역블로팅 방법으로 조사된 DCC 단백질 발현 정도는 암조직에서 정상조직과 비교하여 감소하였고, 면역조직화학적 검사에서도 역시 동일한 결과였기에 임상적으로 보다 간단하게 면역조직화학적 방법으로 DCC 단백질 발현 정도를 조사할 수 있을 것으로 생각한다.

2) DCC 단백질 발현의 감소와 CRC의 원격전이와는 밀접한 상관성이 있었고, 원격전이를 추정할 수 있는 인자 중의 하나로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

3) DCC 단백질 발현의 감소와 DCC 유전자의 이합접합성 상실은 혈청 CEA값과 상관성을 확인할 수 있었으나, 종양의 위치, 크기, 조직학적 유형, 혈관침습, 림프절 전이 등의 임상-병리학적 소견들과의 연관성은 없었다.

위의 연구 결과로 보아 DCC 유전자의 최종적인 산물인 DCC 단백질 발현 정도가 CRC의 원격 전이를 예측할 수 있는 표지자로 임상적으로 사용될 수 있다는 결론에 도달하였다.

REFERENCES

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
2. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
3. Cho KR, Fearon ER. Linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1055-65.
4. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal

- cancers. *N Engl J Med* 1996;335:1727-32.
5. Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroentero Clin North Am* 1997;24: 737-54.
 6. Roesler J, Srivatsan E, Moatamed F, Peters J, Livingston EH. Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma. *Am J Surg* 1997;174:251-7.
 7. Tanaka K, Oshimura M, Kikuchi R, Seki M, Hayashi T, Miyaki M. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 1991;349:340-2.
 8. Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastases. *Semin Cancer Biol* 1993;4:219-29.
 9. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
 10. Kim H, Jen J, Vogelstein B. Clinical and pathological characteristics of sporadic carcinoma with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145:148-56.
 11. Laurent PP, Olschwang S, Delattre O. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992;102:1136-41.
 12. 대한대장항문병학회, 대한외과학회. 한국인 대장암 취급 지침서: 의학문화사; 1988. p. 2-40.
 13. Wiggers T, Arends JW, Schutte B. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988;61:386-95.
 14. Graham DW, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Modern Pathol* 1990;3:332-5.
 15. Jass JR, Love SV, Northover JMA. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303-96.
 16. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal carcinoma. *Science* 1992; 247:49-56.
 17. Parry PJ, Markie D, Fearon ER, Nigro JM, Vogelstein B, Bodmer WF. PCR-based detection of two *MspI* polymorphic sites at D18S8. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6983.
 18. Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992;52:6525-30.
 19. Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, et al. The deleted in colorectal cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996;13:787-95.
 20. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (DCC) gene. *Nature* 1997; 386:796-804.
 21. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Munt NA, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; 395:801-4.
 22. 김종우, 안대호, 정재삼, 이경포, 안희정, 오도연 등. 대장암 조직에서의 DCC 단백질의 발현. *대한대장항문학회지* 1997; 13:317-24.
 23. Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S, Yoshida Y, Sugimura T, Terada M, et al. Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1993;53:382-7.
 24. Carethers TM, Hawn MT, Greenson JK, Hitchcock CL, Boland CR. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1188-95.
 25. Goi T, Yamaguchi A, Nakagawa G, Urno T, Shiku H, Furukawa K. Reduced expression of deleted colorectal cancer protein in established colon cancers. *Br J Cancer* 1998;77:466-71.
 26. Banerjee AK. DCC expression and prognosis in colorectal cancer. *Lancet* 1997;349:968.
 27. Kataoka M, Okabayashi T, Orita K. Decreased expression of DCC mRNA in gastric and colorectal cancer. *Surg Today* 1995;25:1001-7.
 28. Bgent RHJ. The value of carcinoembryonic antigen in clinical practice. *Br J Hosp Med* 1987;April 335.
 29. Keino MK, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996;87:175-85.
 30. Bennett KL, Bradshwa J, Youngman T, Rodgers J, Greenfield B, Aruffo A, et al. Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparan via its fifth fibronectin type III domain. *J Biol Chem* 1997;272:26940-6.
 31. Iacopetta B, DiGrandi S, Dix B. Loss of heterozygosity of tumor suppressor gene loci in human colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 1994;30A:664-71.
 32. Boman B, Wildrick D, Alfaro S. Chromosome 18 allele loss at the D18S6 locus in human colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:463-71.
 33. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes & Development* 1994;8:1174-83.
 34. Muleris M, Salmon R, Dutrillaux A. Characteristic chromosomal imbalance in 18 near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;29:289-97.
 35. Froggatt NJ, Leveson SH, Garner C. Low frequency and late occurrence of p53 and DCC ablations in colorectal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121:7-15.
 36. Masataka K, Yasushi I, Susumu K. Detection of DCC and Ki-ras gene alterations in colorectal carcinoma tissue as prognostic markers for liver metastases recurrence. *Cancer*

1996;77:1729-37.

37. Hiroshi I, Fukuyama M, Maeda Y. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. *Cancer* 1994; 73:1324-31.
38. Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Reisinger AC, et al. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 1994;19:

525-31.

39. Schmitt CA, Thaler KR, Wittig BM, Kaulen H, Meyer zum Buschenfelde KH, Dippold WG. Detection of DCC gene product in normal and malignant colorectal tissues and its relation to a codon 201 mutation. *Br J Cancer* 1998;77: 588-94.
-